

DE19951765

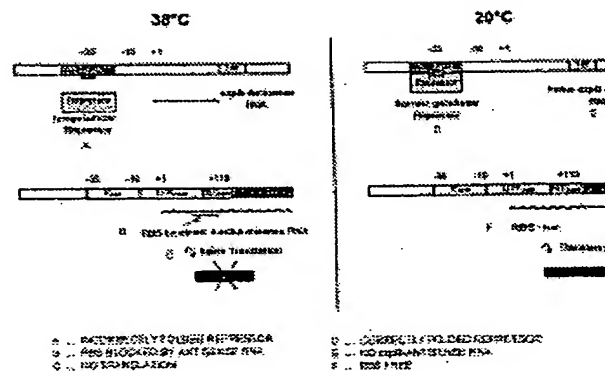
Also published as

EP1224307
(A2)

less <<

Report a data error here

The invention relates to a system for temperature-regulated gene expression, in particular for the over-expression of cold-adapted, thermolabile proteins originating from psychrophilic organisms.





⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 199 51 765 A 1**

⑥ Int. Cl. 7:
C 12 N 15/67
C 12 P 21/02
C 12 N 15/75

⑲ Aktenzeichen: 199 51 765.7
⑳ Anmeldetag: 27. 10. 1999
㉑ Offenlegungstag: 3. 5. 2001

DE 199 51 765 A 1

⑦① Anmelder:
Schweder, Thomas, Dr., 17489 Greifswald, DE

⑦④ Vertreter:
Weickmann & Weickmann, 81679 München

⑦② Erfinder:
Schweder, Thomas, Dr., 17489 Greifswald, DE;
Kaan, Tanja, 17489 Greifswald, DE

⑤⑤ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
zu ziehende Druckschriften:

US	53 86 013 A
EP	08 12 917 A1
WO	99 23 216 A2
WO	98 42 854 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ⑤④ Wirts-Vektor-Systeme zur Überproduktion von thermolabilen Enzymen psychrophiler Organismen
⑤⑦ Die Erfindung betrifft Systeme zur temperaturregulierten Genexpression, insbesondere zur Überexpression von kälteangepaßten, thermolabilen Proteinen aus psychrophilen Organismen.

DE 199 51 765 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft Systeme zur temperaturregulierten Genexpression, insbesondere zur Überexpression von kälteangepaßten, thermolabilen Proteinen aus psychophilen Organismen.

Kälteangepaßte, sogenannte psychophile Organismen können noch bei extrem niedrigen Temperaturen wachsen. Diese Organismen findet man unter anderem im arktischen bzw. antarktischen Eis und Meerwasser sowie in der Tiefsee. Enzyme dieser Organismen zeichnen sich durch eine hohe katalytische Aktivität bei sehr niedrigen Temperaturen, z. B. 4°C aus. Diese Eigenschaft wird durch eine im Vergleich zu Enzymen von wärmeliebenden Organismen flexiblere Proteinstruktur realisiert. Diese größere Thermoflexibilität hat zur Folge, daß übliche großtechnische Produktionsverfahren, die bei 37°C arbeiten, zum Entstehen von partiell denaturierten Produkten führen, die als sogenannte Einschußkörper in den Zellen akkumuliert werden können, und – sofern überhaupt – nur mit geringer Ausbeute renaturiert werden können.

Feller et al. (Appl. Environ. Mikrobiol. 64 (1998), 1163–1165) beschreiben die Überexpression einer kälteangepaßten Amylase aus einem antarktischen Bakterium in dem mesophilen Expressionswirt *Escherichia coli*. Nach Expression bei 37°C konnte keine Amylaseaktivität gemessen werden. Es wurde daher vorgeschlagen, nach erfolgter Überexpression bei 18°C oder 25°C die Fermenterkultur über Nacht bei 4°C zu inkubieren. Durch diese lange Temperaturniedrigung konnte wenigstens die Renaturierung eines Teils der überproduzierten Amylase erreicht werden. Dabei kann jedoch ein proteolytischer Abbau der rekombinanten Kälteproteine durch zelleigene Proteasen während der langen Inkubationsdauer erfolgen. Außerdem ist das Verfahren für eine Produktion im großtechnischen Maßstab ungeeignet.

WO96/03521 beschreibt ein kälteinduzierbares Expressionssystem für den Gram-negativen mesophilen Wirt *Escherichia coli*. Dieses System basiert auf den regulatorischen Sequenzen des Hauptkälteschockproteins von *E. coli*, Csp. Weiterhin wird ein kälteinduzierbares Expressionssystem beschrieben, bei dem ein mutierter Promotor des *E. coli*-Phagen λ (pL) verwendet wird. Dieser Promotor wird durch niedrige Temperaturen von weniger als 20°C aktiv und erlaubt somit eine selektive Expression rekombinanter Proteine unter diesen Bedingungen. Die beschriebenen Expressionssysteme sollen eine korrekte Faltung rekombinanter Proteine bei Temperaturen unter 20°C ermöglichen. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist die Beschränkung auf das Gram-negative Bakterium *E. coli*, welches bei geringen Temperaturen nur ein sehr schlechtes Wachstum zeigt.

Das wirtschaftliche Potential von kälteangepaßten Proteinen, z. B. Enzymen, ist sehr hoch einzuschätzen. Vor allem in der Lebensmittelverarbeitung und in der molekularbiologischen Diagnostik finden diese Proteine ein weites Anwendungsspektrum, welches bisher jedoch aufgrund der hohen Produktionskosten begrenzt war. Es besteht daher ein Bedürfnis, Systeme und Verfahren zu entwickeln, die eine kostengünstige und großtechnische Produktion thermolabiler Proteine ermöglichen.

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung eines neuen temperaturregulierbaren Expressionssystems gelöst, welches vorzugsweise auf einer Expressionskontrollsequenz eines für ein Kälteschockprotein kodierenden Gens, insbesondere des *cspB*-Gens aus *B. subtilis* basiert und dessen Regulation durch einen Antisense-RNA-Mechanismus erfolgt. Das System ermöglicht eine kälteinduzierbare Überexpression in einer Vielzahl von Organismen, z. B. eukaryonti-

schen Zellen wie Hefen, z. B. *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* u. a. und Pilzen z. B. *Aspergillus niger* u. a., oder prokaryontischen Zellen, z. B. *Escherichia coli*, *Lactobacillus lactis*, *Staphylococcus carnosus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus brevis* u. a., insbesondere in Gram-positiven Bakterien, z. B. in *Bacillus subtilis*, aber auch in Gram-negativen Bakterien. Das System basiert vorzugsweise auf einem Promotor, der bei geringen Temperaturen aktiv, jedoch nicht kälteinduzierbar ist. Aber auch kälteinduzierbare Promotoren können eingesetzt werden. Die Verwendung des Gram-positiven Mikroorganismus *B. subtilis* als Expressionswirt ist weiterhin bevorzugt, da dieser besser an Temperaturen von 20°C angepaßt ist als *E. coli*, und im Vergleich zu *E. coli* besser zur Sekretion rekombinanter Proteine ins extrazelluläre Medium befähigt ist. Aufgrund dieser Charakteristika wird durch das erfindungsgemäße Expressionssystem ein effektiverer Fermentationsprozeß bei niedrigen Temperaturen und eine effizientere und weniger kostspieligere Reinigung der gewünschten Proteine nach Überexpression ermöglicht.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein System zu temperaturregulierten Genexpression umfassend

(a) eine Genexpressionseinheit enthaltend eine erste Expressionskontrollsequenz mit einem Promotor und einer ribosomalen Bindungsstelle, und

(b) eine Regulationseinheit enthaltend eine Nukleinsäure, die bei Transkription eine zur ersten Expressionskontrollsequenz komplementäre Antisense-RNA ergibt, in operativer Verknüpfung mit einer temperaturregulierbaren zweiten Expressionskontrollsequenz.

Die zweite Expressionskontrollsequenz ist vorzugsweise kälteregulierbar, d. h. bei einer hohen Temperatur von z. B. 37°C wird die Transkription von Antisense-RNA vermittelt durch die zweite Expressionskontrollsequenz erlaubt, wodurch bewirkt wird, daß die Translation eines durch die erste Expressionskontrollsequenz erzeugten Transkripts aufgrund einer Bindung der Antisense-RNA an das Transkript zumindest teilweise reprimiert ist. Auf diese Weise wird ein Fermentationsprozeß ermöglicht, bei dem in einer ersten Phase, der sogenannten Wachstumsphase bei höheren Temperaturen, ein schnelles Wachstum der Wirtszellen erfolgt, während bei diesen Bedingungen keine oder nur sehr schwache Expression des gewünschten Proteins stattfindet. Sobald eine genügend hohe Zelldichte erreicht ist, kann dann die zweite Phase der Fermentation, die sogenannte Produktionsphase beginnen. In dieser Phase wird das Expressionssystem durch Temperaturverringerung induziert und das rekombinante Protein überproduziert.

Die durch Antisense-RNA vermittelte Temperaturregulation kann grundsätzlich durch zwei verschiedene Ausführungsformen realisiert werden. In einer ersten Ausführungsform erfolgt eine Transkription der Antisense-RNA nur bei hohen Temperaturen von z. B. 37°C. Eine Bindung dieser Antisense-RNA an die durch die erste Expressionskontrollsequenz erzeugte mRNA stromaufwärts oder/und im Bereich der Ribosomenbindungsstelle verhindert eine Initiation der Translation des Fremdproteins. Die temperaturregulierte Transkription der Antisense-RNA kann durch Verwendung temperatursensitiver Repressoren erfolgen, z. B. des temperatursensitiven Repressors CI587 des *E. coli* Phagen λ , der nur bei Temperaturen unterhalb 37°C korrekt gefaltet und damit aktiv ist. Dies hat zur Folge, daß bei einer Temperaturerniedrigung auf 20°C der Repressor an seine Operatorregion bindet und damit eine Transkription der Antisense-DNA vermittelt durch die zweite Expressionskontrollsequenz verhindert. Damit wird keine neue Antisense-

RNA bei dieser Temperatur gebildet. Neu von der ersten Expressionkontrollsequenz erzeugte mRNA-Moleküle sind nicht mehr blockiert und können sich an die Ribosomen anlagern, eine Translation der Fremdproteine wird gestartet.

In einer zweiten Ausführungsform der Erfindung wird eine Antisense-RNA derart konstruiert, daß sie bei einer Temperaturerniedrigung auf 20°C eine Sekundärstruktur ausbildet, so daß sie sich nicht mehr an die Ziel-mRNA anlagern kann. Mit Hilfe von entsprechenden Computerprogrammen können entsprechende mRNA-Sekundärstrukturen vorausgerechnet werden. So können ausgehend von einer gegebenen Sequenz durch schrittweise Veränderung entsprechende Antisense-RNA-Moleküle erzeugt werden, die bei 20°C eine stabile Sekundärstruktur aufweisen, die nicht mehr an die Ziel-mRNA bindet. In dieser Ausführungsform wird die Expression der Antisense-RNA durch einen vorzugsweise schwachen konstitutiven Promotor oder durch einen durch Temperaturverringerung auf 20°C abschaltbaren Promotor realisiert.

Die Antisense-RNA weist vorzugsweise eine Länge bis zu 200 Nukleotiden auf, es sind jedoch auch kürzere Antisense-RNA Moleküle möglich.

Vorzugsweise beträgt die Länge des komplementären Sequenzabschnitts der Antisense-RNA Moleküle 20 bis 100 Nukleotide. Die Sequenz der Antisense-DNA wird so gewählt, daß die davon durch Transkription erzeugten RNA-Moleküle mindestens teilweise die ribosomale Bindestelle der von der ersten Expressionseinheit transkribierten mRNA blockieren.

Die Genexpressionseinheit des erfindungsgemäßen Systems enthält eine erste Expressionskontrollsequenz, die vorzugsweise zur Expression thermolabiler Proteine geeignet ist, d. h. bei Temperaturen von $\leq 20^\circ\text{C}$ eine effiziente Transkription und Translation ermöglicht. Die erste Expressionskontrollsequenz umfaßt daher günstigerweise den Promotor oder/und die ribosomale Bindestelle eines Kälteschockgens, beispielsweise das *cspB*-Gens von *B. subtilis*.

Zusätzlich kann die erste Expressionskontrollsequenz stromabwärts der ribosomalen Bindestelle eine translatierbare Nukleotidsequenz, insbesondere eine effizient bei niedrigen Temperaturen translatierbare Nukleotidsequenz enthalten, die zur Verbesserung der Translationseffizienz der gewünschten Proteine dient. Diese translatierbare Nukleotidsequenz kann z. B. für den N-Terminus von Kälteschockproteinen kodieren, z. B. für die ersten 10 bis 20 Aminosäuren von *CspB*. Am Ende der translatierbaren Nukleotidsequenz kann ein Stopcodon lokalisiert sein, so daß die Translation in Form eines Cistrons mit zwei separaten kodierenden Bereichen (translationsverbesserndes Peptid bzw. Polypeptid und gewünschtes rekombinantes Protein) erfolgt. Alternativ kann das gewünschte rekombinante Protein auch als Fusionsprotein mit dem translationsverbessernden Peptid bzw. Polypeptid exprimiert werden, wobei in diesem Fall eine Spaltstelle, z. B. eine proteolytische Spaltstelle zwischen den beiden genannten Domänen des Fusionsproteins eingebaut werden kann.

Die Genexpressionseinheit kann weiterhin eine Klonierungsstelle in operativer Verknüpfung mit der Expressionskontrollsequenz enthalten, um die Einklonierung eines gewünschten Zielgens zu ermöglichen. In einer anderen Ausführungsform der Erfindung kann die Genexpressionseinheit bereits ein Strukturgen, welches vorzugsweise für ein thermolabiles Protein kodiert, in operativer Verknüpfung mit der Expressionskontrollsequenz enthalten.

Das erfindungsgemäße Genexpressionssystem kann auf einem oder zwei Vektoren oder auch auf dem Chromosom einer Wirtszelle lokalisiert sein. Die Vektoren sind vorzugsweise prokaryontische Vektoren, d. h. Vektoren, die zur Pro-

pagierung in einer prokaryontischen Wirtszelle fähig sind. Beispiele für derartige Vektoren sind Plasmidvektoren, Bakteriophagen, Cosmide, etc. Bevorzugt werden Vektoren verwendet, die für eine Propagierung in Grampositiven prokaryontischen Wirtszellen, insbesondere *B. subtilis*, geeignet sind. Die Vektoren weisen einen für die jeweilige Wirtszelle geeigneten Replikationsursprung sowie vorzugsweise ein Antibiotikumresistenzgen auf, um eine Selektion zu ermöglichen.

Die Erfindung betrifft weiterhin eine Zelle, die ein erfindungsgemäßes Expressionssystem enthält. Vorzugsweise ist die Zelle eine Gram-positive Zelle, insbesondere eine *B. subtilis* Zelle.

Das erfindungsgemäße Expressionssystem und die erfindungsgemäße Zelle können in einem Verfahren zur gentechnischen Herstellung von Polypeptiden, insbesondere von thermolabilen Polypeptiden in Prokaryonten verwendet werden.

Die Erfindung betrifft somit auch ein Verfahren zur gentechnischen Herstellung von Polypeptiden in einer prokaryontischen Zelle, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man

- (i) eine Zelle bereitstellt, die ein erfindungsgemäßes Expressionssystem enthält,
- (ii) die Zelle aus (i) in einem geeigneten Medium und unter geeigneten Bedingungen kultiviert, die zu einer Expression des gewünschten Polypeptids führen, und
- (iii) das Polypeptid aus der Zelle oder aus dem Medium isoliert.

Die Kultivierung der Zelle in Schritt (ii) des erfindungsgemäßen Verfahrens wird vorzugsweise auf solche Weise durchgeführt, daß bis zum Erreichen einer vorbestimmten Zelldichte die Expression des für das gewünschte Polypeptid kodierenden Gens weitgehend reprimiert ist, d. h. unter Bedingungen, bei denen die Translation der durch die erste Expressionskontrollsequenz transkribierten mRNA durch die von der zweiten Expressionskontrollsequenz transkribierten Antisense-RNA zumindest weitgehend unterdrückt wird. Nach Erreichen einer vorbestimmten Zelldichte wird durch Temperaturänderung, insbesondere Temperaturverringerung auf Temperaturen von 20°C, die Expression des gewünschten Polypeptids induziert.

Die Erfindung wird weiterhin durch nachfolgende Figuren erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 die regulatorische Sequenz des Kälte-Schockgens *cspB* von *B. subtilis* bis zum Startcodon ATG,

Fig. 2 die regulatorische Sequenz des Kälte-Schockgens *cspB* von *B. subtilis* bis zum 16. Codon der kodierenden Sequenz, einem anschließenden Stopcodon TAA und einem zweiten Startcodon (für eine Expression als Cistron mit zwei kodierenden Bereichen),

Fig. 3A ein Beispiel für eine Antisense-RNA zu *cspB* von *B. subtilis*,

Fig. 3B eine schematische Darstellung der Regulation der Synthese dieser Antisense-RNA; das Gen für den thermolabilen Repressor, z. B. *cl857* kann entweder auf einem Plasmid vorliegen oder im Chromosom integriert sein,

Fig. 4 die schematische Darstellung einer ersten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Expressionssystems (Regulation der Antisense-RNA über einen temperatursensitiven Repressor) und

Fig. 5 Beispiele für Antisense-RNA Moleküle mit temperaturlabilen Sekundärstrukturen, die für eine zweite Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens geeignet sind.

Patentansprüche

1. System zur temperaturregulierten Genexpression umfassend
 - (a) eine Genexpressionseinheit enthaltend eine erste Expressionskontrollsequenz mit einem Promotor und einer ribosomalen Bindungsstelle,
 - (b) eine Regulationseinheit enthaltend eine Nukleinsäure, die bei Transkription eine zur ersten Expressionskontrollsequenz komplementäre Antisense-RNA ergibt, in operativer Verknüpfung mit einer temperaturregulierbaren zweiten Expressionskontrollsequenz.
2. System nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die zweite Expressionskontrollsequenz so gewählt ist, daß bei einer hohen Temperatur die Transkription von Antisense-RNA vermittelt durch die zweite Expressionskontrollsequenz erfolgt und die Translation vermittelt durch die erste Expressionskontrollsequenz zumindest teilweise reprimiert ist.
3. System nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die erste Expressionskontrollsequenz zur Expression thermolabiler Proteine geeignet ist.
4. System nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die erste Expressionskontrollsequenz den Promotor oder/und die ribosomale Bindungsstelle eines Kälteschockgens umfaßt.
5. System nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Kälteschockgen das cspB Gen von *B. subtilis* ist.
6. System nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß stromabwärts der ribosomalen Bindungsstelle der ersten Expressionskontrollsequenz noch eine effizient translatierbare Nukleotidsequenz angeordnet ist.
7. System nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Genexpressionseinheit (a) weiterhin eine Klonierungsstelle in operativer Verknüpfung mit der Expressionskontrollsequenz enthält.
8. System nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Genexpressionseinheit (a) weiterhin ein Strukturgen in operativer Verknüpfung mit der Expressionskontrollsequenz enthält.
9. System nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Strukturgen für ein thermolabiles Protein kodiert.
10. System nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Transkription der Antisense-RNA durch einen temperatursensitiven Repressor reguliert ist.
11. System nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Antisense-RNA eine thermolabile Sekundärstruktur aufweist.
12. System nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Antisense-RNA eine Länge bis zu 200 nt aufweist.
13. Zelle enthaltend ein Expressionssystem nach einem der Ansprüche 1 bis 12.
14. Zelle nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Gram-positive Zelle, insbesondere eine *B. subtilis* Zelle ist.
15. Verfahren zur gentechnischen Herstellung von Polypeptiden in einer prokaryontischen Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - (i) eine Zelle bereitstellt, die ein Expressionssystem nach einem der Ansprüche 1 bis 12 enthält,
 - (ii) die Zelle aus (i) in einem geeigneten Medium

und unter geeigneten Bedingungen kultiviert, die zu einer Expression des gewünschten Polypeptids führen, und

(iii) das Polypeptid aus der Zelle oder aus dem Medium isoliert.

16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Bedingungen in Schritt (ii), die zu einer Expression des Polypeptids führen, eine Kultivierung bei $\leq 20^\circ\text{C}$ umfassen.

17. Verfahren nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß ein Polypeptid aus einem psychophilen Organismus hergestellt wird.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

Abbildung 1

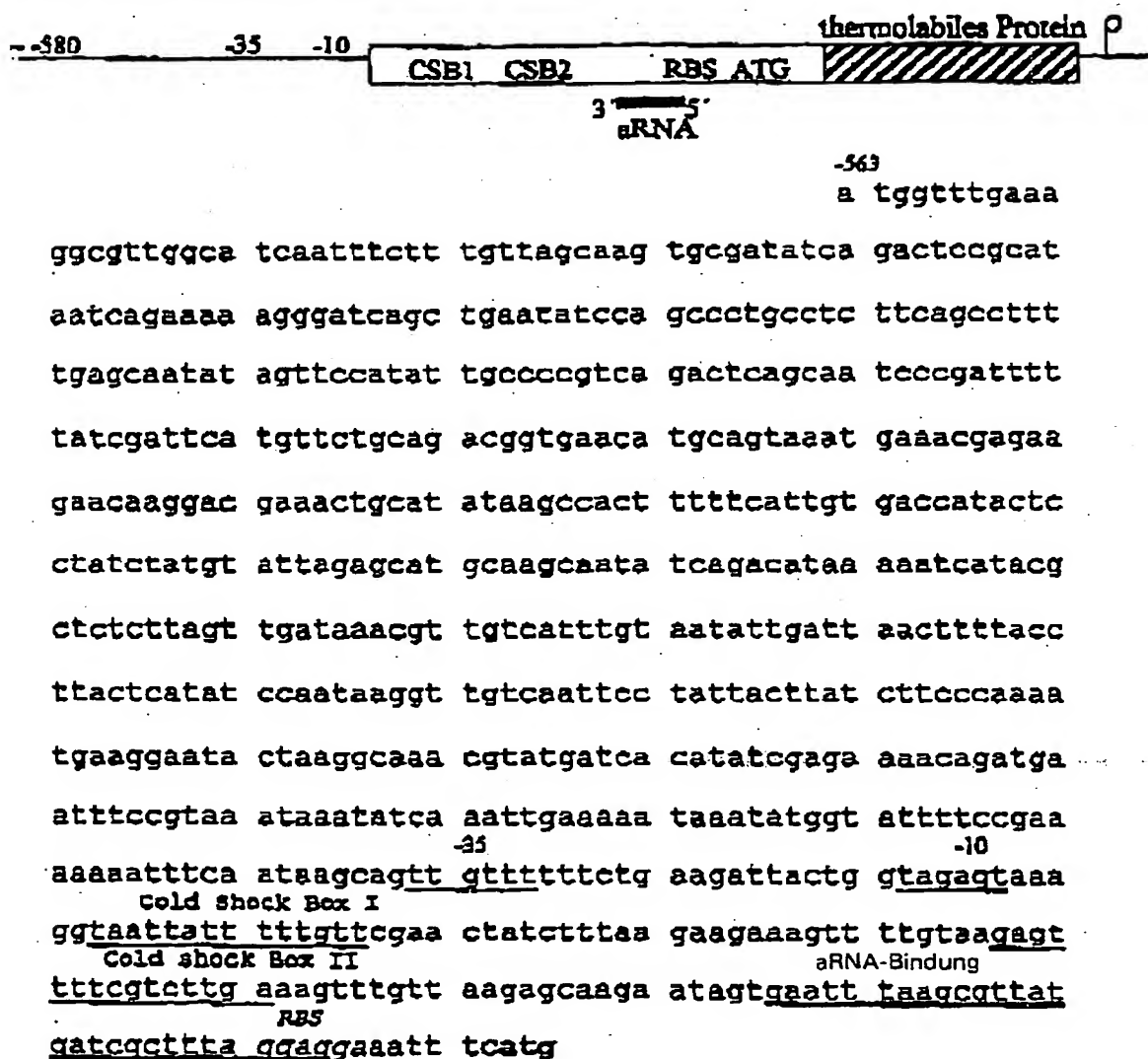


Abbildung 2

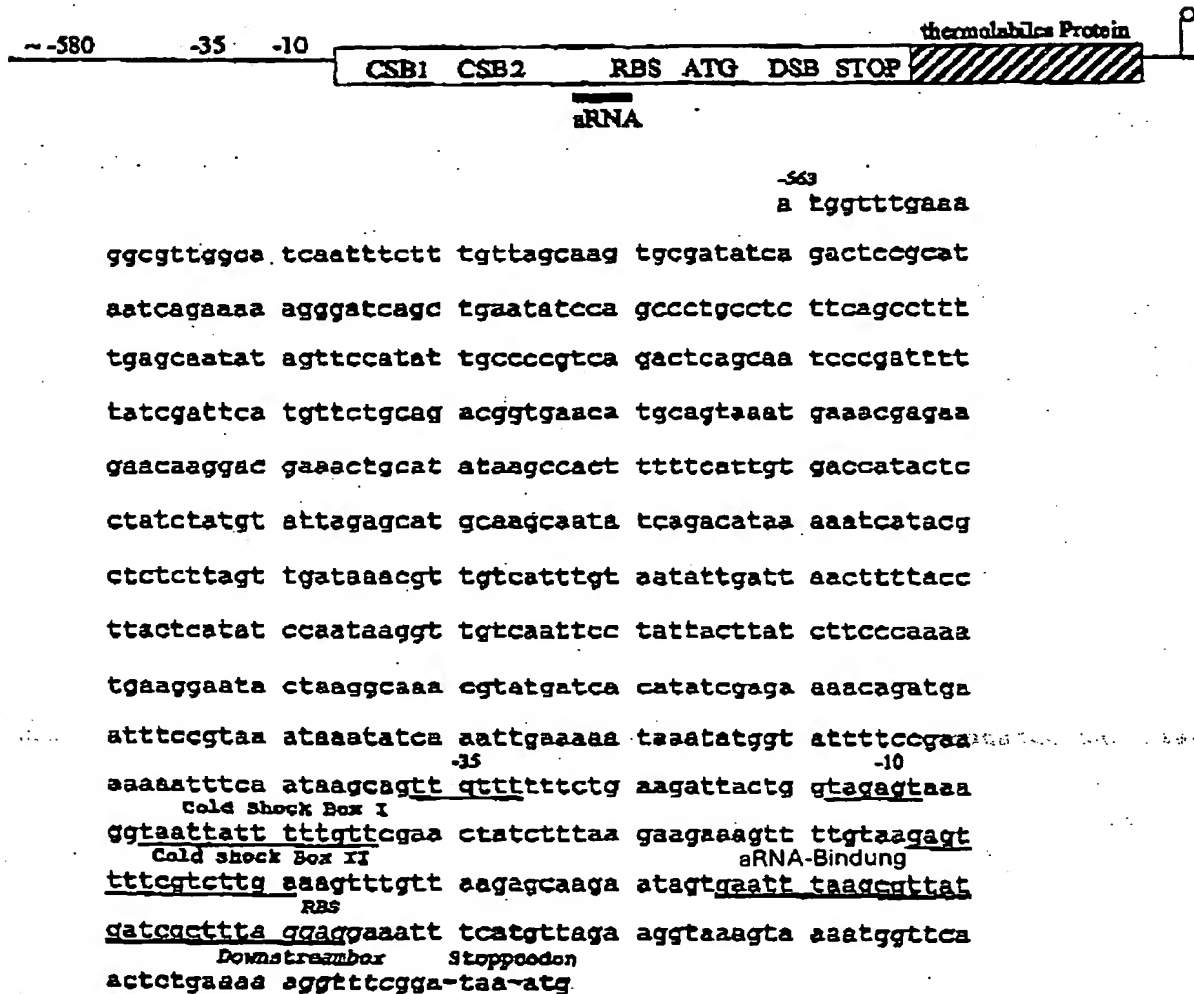


Abbildung 3

A

λP_L - cII RBS-ctcctaaagcgatcataacgcttaaattcccc- Terminator

gama= Gen für Antisense RNA

B

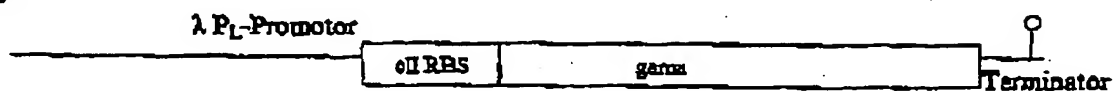
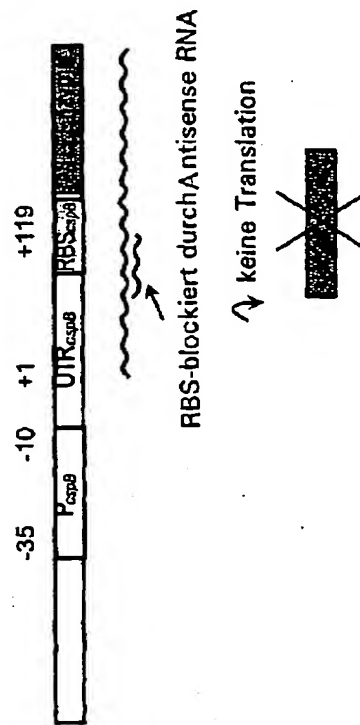
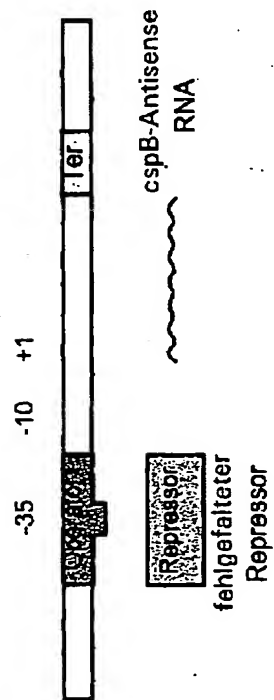


Abbildung 4

38°C



20°C

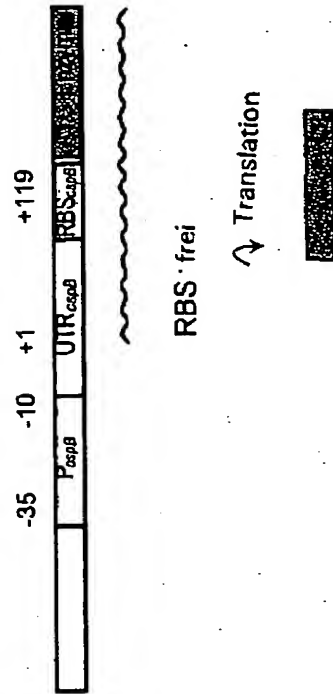
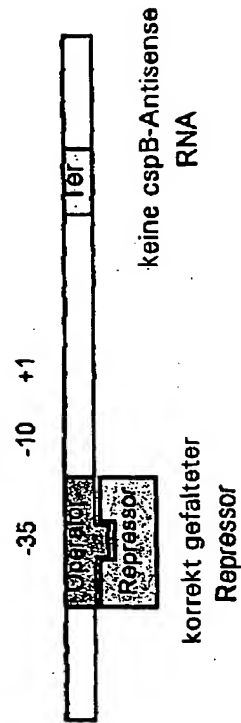
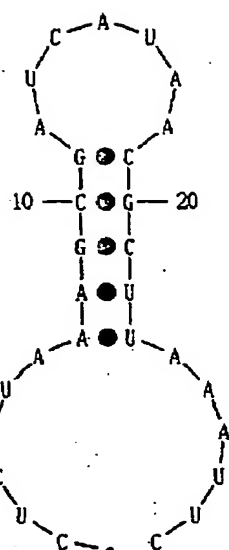
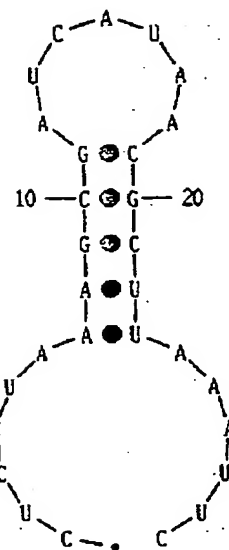


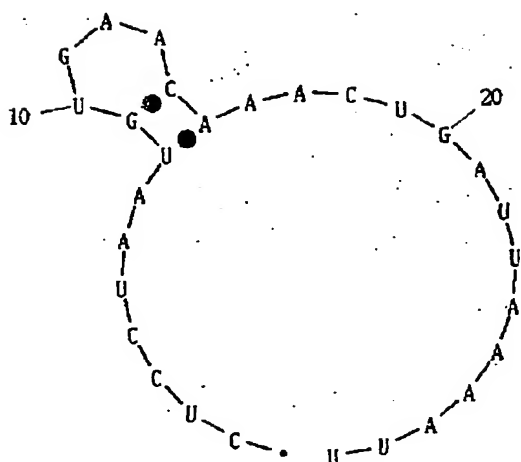
Abbildung 5



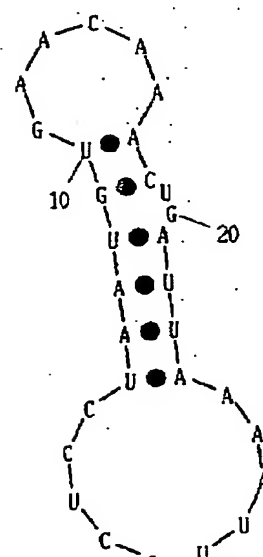
$\Delta G = -4.5$ [initially -4.5] ΔG_{mut1}



$\Delta G = -7.6$ ΔG_{mut1}



$\Delta G = -0.5$ [initially -0.5] ΔG_{mut11}



$\Delta G = -2.2$ ΔG_{mut11}